PROGENSA PCA3 Assay

Per uso diagnostico *in vitro*.

Solo per esportazione dagli USA.

Informazioni generali

Uso previsto

Il PROGENSA PCA3 Assay è una prova di amplificazione dell’acido nucleico (NAAT) *in vitro* che rileva l’acido ribonucleico messaggero (RNA) del gene 3 del cancro alla prostata (PCA3) in campioni di urina maschile per generare un punteggio definito “PCA3 Score”. Il PCA3 Score è concepito per l’uso insieme ad algoritmi diagnostici standard di cura come ausilio nella diagnosi del cancro alla prostata.

Sommario e spiegazione della prova

L’uso della prova dell’antigene sierico specifico della prostata (PSA) per lo screening del cancro alla prostata ha portato alla diagnosi bioptica di tumori più piccoli e precedentemente non rilevati (1), creando così un nuovo dilemma diagnostico: solo una frazione di uomini che presentano aumentati livelli di PSA sierico hanno un cancro alla prostata rilevabile. Gli uomini con almeno una biopsia negativa spesso presentano livelli persistentemente aumentati di PSA sierico, dovuti principalmente a prostate ingrossate e ad iperplasia prostatica benigna (IPB). Eppure, una proporzione significativa di uomini con livelli leggermente aumentati di PSA sierico (2,5-4,0 µg/l) presentano, o svilupperanno, un cancro alla prostata clinicamente significativo (1). Sebbene la biopsia resti il “gold standard” per il rilevamento del cancro alla prostata, prove più accurate, con una migliore specificità, sono necessarie per aiutare a guidare la decisione di eseguire una biopsia della prostata.

Il PCA3 (noto anche come “$PCA3^{DD3}$” o “$DD3^{PCA3}$”) è un RNA non codificante specifico della prostata che viene iperespresso in elevate quantità nelle cellule cancerose della prostata, con un livello mediano di 66 volte superiore alla norma rispetto al tessuto benigno adiacente (2). In contrasto, l’espressione del gene PSA è simile nelle cellule cancerose e in quelle benigne; i livelli di RNA del PSA possono quindi essere usati per standardizzare la quantità di acido ribonucleico (RNA) specifico della prostata nei campioni per le prove molecolari. È stata dimostrata l’attuabilità di analisi molecolari quantitative basate su PCA3 partendo da sedimenti di urina (2) e da urina intera (3).

Il PROGENSA PCA3 Assay utilizza urina intera raccolta a seguito di esame digito-rettale (DRE) consistente in tre pressioni per ciascun lobo. Il DRE libera le cellule della prostata - attraverso il sistema di dotti di quest’ultima - nel tratto urinario, dove possono essere raccolte nell’urina di primo getto. L’urina viene trattata mediante l’aggiunta del Mezzo di trasporto dell’urina (UTM), che provoca la lisi delle cellule e stabilizza l’RNA. Gli RNA di PCA3 e PSA vengono quantificati, e il PCA3 Score viene determinato in base al rapporto dell’RNA di PCA3 e PSA. Oltre a standardizzare il segnale del PCA3, la misurazione dell’RNA del PSA serve anche a confermare che il prodotto di RNA specifico della prostata è sufficiente a generare un risultato valido. Un PCA3 Score superiore è correlato ad una più alta probabilità di una biopsia della prostata positiva.

Principi della procedura

Il PROGENSA PCA3 Assay è composto da due prove quantitative di amplificazione degli acidi nucleici. Il PROGENSA PCA3 Assay combina le tecnologie di cattura del target, dell’amplificazione mediata dalla trascrizione (TMA) e del dosaggio con protezione dell’ibridizzazione (HPA) per - rispettivamente - sveltire il trattamento dei campioni di urina, amplificare l’RNA target e rilevare l’amplicone.

Quando il PROGENSA PCA3 Assay viene eseguito in laboratorio, le molecole di RNA target vengono isolate dai campioni di urina mediante cattura del target. Gli oligonucleotidi (“oligonucleotidi di cattura”) che sono complementari alle regioni specifiche della sequenza dei target vengono ibridizzati ai target presenti nel campione di urina. Per ciascun target viene usato un oligonucleotide di cattura separato. Il target ibridizzato viene quindi catturato su microparticelle magnetiche che vengono separate dal campione di urina in un campo magnetico. Processi di lavaggio vengono utilizzati per rimuovere i componenti estranei dalla provetta di reazione. I procedimenti di separazione magnetica e lavaggio vengono eseguiti con un sistema di target capture.

L’amplificazione del target si verifica mediante TMA, che è un metodo di amplificazione degli acidi nucleici basato su trascrizione che utilizza due enzimi, la trascrittasi inversa del virus della leucemia murina di Moloney (MMLV) e la polimerasi dell’RNA T7. Per ciascun target viene usata una serie univoca di primer. La trascrittasi inversa viene usata per generare una copia di acido desossiribonucleico (DNA) (contenente una sequenza promotrice per la polimerasi dell’RNA T7) della sequenza target. La polimerasi dell’RNA T7 produce copie multiple di amplicone di RNA dal modello della copia di DNA.

Il rilevamento viene ottenuto mediante HPA usando sonde di acido nucleico con filamento unico e marcatura chemiluminescente che sono complementari all’amplicone. Per ciascun amplicone di target vengono usate sonde separate. Le sonde di acido nucleico marcate si ibridizzano specificamente con l’amplicone. Il reagente di selezione distingue le sonde ibridizzate da quelle non ibridizzate inattivando il marcatore sulle sonde non ibridizzate. Durante il rilevamento, il segnale chemioluminescente emesso dalla sonda ibridizzata viene misurato in un luminometro ed espresso in unità di luce relativa (RLU).

Gli RNA di PCA3 e PSA vengono quantificati in provette di reazione separate e viene determinato il PCA3 Score. I calibratori contenenti quantità note di trascritti di RNA di PCA3 o PSA vengono inclusi in ogni seduta di dosaggio e usati per generare una curva standard. I controlli di PCA3 e PSA vengono anch’essi inclusi per verificare l’accuratezza dei risultati interpolati in base alla curva standard.

Reagenti e materiali forniti

Reagenti e materiali forniti nel PROGENSA PCA3/PSA Assay Kit per il PROGENSA PCA3 Assay sono indicati sotto. Accanto al nome di ciascun reagente è indicato anche il rispettivo simbolo identificativo.

PROGENSA PCA3 Assay Kit, 2 x 100 reazioni, N. di catalogo 302355 (8 scatole)

PROGENSA PCA3 100-Reaction Kit

PROGENSA PCA3 Scatola refrigerata – Conservare tra 2 °C e 8 °C dal momento del ricevimento fino alla data di scadenza indicata

Simbolo	Componente	Quantità
A	**PCA3 Reagente di amplificazione** *Acidi nucleici non infettivi liofilizzati in soluzione tamponata HEPES contenente < 10% di agente strutturante.*	1 fiala
E	**Reagente enzimatico PCA3/PSA** *Trascrittasi inversa e polimerasi dell'RNA liofilizzate in soluzione tamponata HEPES contenente < 10% di reagente strutturante.*	1 fiala
P	**Reagente sonda PCA3** *Sonde di DNA non infettive chemiluminescenti liofilizzate in soluzione tamponata con succinato contenente < 5% di agente strutturante e < 5% di lauril solfato di litio.*	1 fiala

PROGENSA PCA3 Scatola a temperatura ambiente – Conservare tra 15 °C e 30 °C dal momento del ricevimento fino alla data di scadenza indicata

Simbolo	Componente	Quantità
AR	**Soluzione di ricostituzione per amplificazione PCA3** *Soluzione acquosa contenente conservanti (< 1% di parabenzoati).*	1 x 9,3 ml
ER	**Soluzione di ricostituzione dell'enzima PCA3/PSA** *Soluzione tamponata con HEPES contenente un surfattante (Triton X-100 al 10%) e glicerolo al 20%.*	1 x 3,3 ml
PR	**Soluzione di ricostituzione della sonda PCA3/PSA** *Soluzione tamponata con succinato contenente < 5% di lauril solfato di litio.*	1 x 12,4 ml
S	**PCA3/PSA Reagente di selezione** *Soluzione tamponata con borato contenente surfattante (Triton X-100 all'1%).*	1 x 31 ml
TCR	**Reagente di cattura del target PCA3** *Acido nucleico non infettivo in soluzione tamponata HEPES contenente una fase solida.*	1 x 22 ml
	Fogli sigillanti	1 confezione
	Collari per ricostituzione	1 confezione

PROGENSA PCA3 Kit di calibratori e controlli – Conservare tra 2 °C e 8 °C dal momento del ricevimento fino alla data di scadenza indicata

Simbolo	Componente	Quantità
CAL	**Calibratore 1 PCA3** *Soluzione tamponata con fosfato contenente < 5% di lauril solfato di litio.*	1 x 2,0 ml
CAL	**Calibratori PCA3 2-5** *Acido nucleico di PCA3 non infettivo in soluzione tamponata con fosfato contenente < 5% di lauril solfato di litio.*	4 x 1,7 ml
PC	**Controlli positivi PCA3** *Acido nucleico di PCA3 non infettivo in soluzione tamponata con fosfato contenente < 5% di lauril solfato di litio.*	2 x 1,7 ml
	Scheda informativa sulla concentrazione di PCA3	1 foglio

PROGENSA PSA 100-Reaction Kit

PROGENSA PSA Scatola refrigerata – Conservare tra 2 °C e 8 °C dal momento del ricevimento fino alla data di scadenza indicata

Simbolo	Componente	Quantità
A	**Reagente di amplificazione del PSA** *Acidi nucleici non infettivi liofilizzati in soluzione tamponata HEPES contenente < 10% di agente strutturante.*	1 fiala
E	**Reagente enzimatico PCA3/PSA** *Trascrittasi inversa e polimerasi dell'RNA liofilizzate in soluzione tamponata HEPES contenente < 10% di reagente strutturante.*	1 fiala
P	**Reagente sonda PSA** *Sonde di DNA non infettive chemiluminescenti liofilizzate in soluzione tamponata con succinato contenente < 5% di agente strutturante e < 5% di lauril solfato di litio.*	1 fiala

PROGENSA PSA Scatola a temperatura ambiente – Conservare tra 15 °C e 30 °C dal momento del ricevimento fino alla data di scadenza indicata

Simbolo	Componente	Quantità
AR	**Soluzione di ricostituzione per amplificazione PSA** *Soluzione acquosa contenente conservanti (< 1% di parabenzoati).*	1 x 9,3 ml
ER	**Soluzione di ricostituzione dell'enzima PCA3/PSA** *Soluzione tamponata con HEPES contenente un surfattante (Triton X-100 al 10%) e glicerolo al 20%.*	1 x 3,3 ml
PR	**Soluzione di ricostituzione della sonda PCA3/PSA** *Soluzione tamponata con succinato contenente < 5% di lauril solfato di litio.*	1 x 12,4 ml
S	**PCA3/PSA Reagente di selezione** *Soluzione tamponata con borato contenente surfattante (Triton X-100 all'1%).*	1 x 31 ml
TCR	**Reagente di cattura del target PSA** *Acido nucleico non infettivo in soluzione tamponata HEPES contenente una fase solida.*	1 x 22 ml
	Fogli sigillanti	1 confezione
	Collari per ricostituzione	1 confezione

PROGENSA PSA Kit di calibratori e controlli – Conservare tra 2 °C e 8 °C dal momento del ricevimento fino alla data di scadenza indicata

Simbolo	Componente	Quantità
CAL	**Calibratore 1 PSA** *Soluzione tamponata con fosfato contenente < 5% di lauril solfato di litio.*	1 x 2,0 ml
CAL	**Calibratori 2-5 PSA** *Acido nucleico di PSA non infettivo in soluzione tamponata con fosfato contenente < 5% di lauril solfato di litio.*	4 x 1,7 ml
PC	**Controlli positivi PSA** *Acido nucleico di PSA non infettivo in soluzione tamponata con fosfato contenente < 5% di lauril solfato di litio.*	2 x 1,7 ml
	Scheda informativa sulla concentrazione di PSA	1 foglio

Liquidi per APTIMA Assay – Conservare tra 15 °C e 30 °C (2 scatole) dal momento del ricevimento fino alla data di scadenza indicata

Simbolo	Componente	Quantità
W	**Soluzione di lavaggio** *Soluzione tamponata HEPES contenente < 2% di dodecilsolfato di sodio.*	1 x 402 ml
DF	**Tampone per fluido di disattivazione** *Soluzione tamponata con bicarbonato.*	1 x 402 ml
O	**Reagente oleoso** *Olio di silicone.*	1 x 24,6 ml

Nota - *Tutti i materiali inclusi nel kit PROGENSA PCA3 Assay possono anche essere acquistati separatamente (vedere la sezione Materiali per dettagli in merito).*

Materiali

__Nota -__ Per i materiali disponibili presso Gen-Probe sono indicati i rispettivi numeri di catalogo.

Materiali richiesti ma disponibili separatamente

	N. di cat.
PROGENSA PCA3 Urine Specimen Transport Kit	302352
LEADER HC+ Luminometer	104747
Sistema di cattura del target (TCS) GEN-PROBE	104555
Kit Auto Detect APTIMA	301048
2 pipettatori eppendorf Repeater Plus	105725
Puntali per pipettatori a ripetizione (2,5 ml, 5,0 ml, 25,0 ml)	—
Uno dei seguenti articoli:	—
2 miscelatori vortex per unità multiprovetta — *102160F*	
3 bagni di acqua circolante (62 °C ± 1 °C, 42 °C ± 1 °C, 62 °C ± 1 °C) — *104586F*	
3 distanziatori per bagni di acqua — *104627*	
OPPURE	
2 SB100 Dry Heat Bath/Vortexer — *105524F*	
Ulteriori strumenti SB100 potrebbero essere richiesti, a seconda della produttività desiderata	
Micropipettatore, 1000 µl RAININ PR1000	901715
Puntali, 1000 µl P1000	105049
Pipettatore, eppendorf da 20 a 200 µl	105726
Puntali, pipetta da 20-200 µl	—
Candeggina, dal 5% al 7% (da 0,7 M a 1,0 M) soluzione di ipoclorito di sodio	—
Contenitore di plastica con coperchio grande	—
Contenitori standard per la raccolta di urina, senza conservanti	—
Unità a dieci provette (TTU)	TU0022
Vassoi con dieci puntali (TTC)	104578
Standard di calibrazione SysCheck	301078

Materiali opzionali

	N. di cat.
PROGENSA PCA3 100-Reaction Kit	302354
PROGENSA PSA 100-Reaction Kit	302357
PROGENSA PCA3 Calibrators and Controls Kit	302353
PROGENSA PSA Calibrators and Controls Kit	302356

		N. di cat.
PROGENSA PCA3/PSA Proficiency Panels		302350
PROGENSA PCA3 Specimen Diluent Kit		302351
Kit di liquidi per dosaggio APTIMA		302002C
Puntali monouso per pipetta con filtro (1 ml)		10612513 (Tecan)
TECAN Freedom EVO 100/4		900932
Gruppo piastra del piano PCA3, DTS 800	*902021*	—
Serbatoio del reagente (modulo diviso in quattro, da 40 ml)	*104765*	
Serbatoio del reagente diviso (modulo diviso in quattro da 19 ml x 2)	*901172*	
Provette di trasporto		302521
Tappi di ricambio perforabili		302520
Tappi di ricambio non perforabili		103036A

Avvertenze e precauzioni

A. Per uso diagnostico *in vitro*.

B. Solo per esportazione dagli USA.

Pertinenti al laboratorio

C. Usare solo contenitori da laboratorio monouso forniti o indicati in modo specifico come monouso.

D. Adottare le consuete precauzioni di laboratorio. Non mangiare, bere o fumare nelle aree di lavoro. Quando si maneggiano campioni di urina e reagenti del kit, indossare guanti monouso senza talco, occhiali protettivi e camici da laboratorio. Lavarsi accuratamente le mani dopo aver maneggiato campioni di urina e reagenti del kit.

E. **Avvertenza – irritanti, corrosivi.** Evitare il contatto dell’Auto Detect 1 e dell’Auto Detect 2 con la pelle, gli occhi e le mucose. Se questi liquidi vengono a contatto con la pelle o con gli occhi, risciacquare con acqua le zone colpite. Se questi liquidi si rovesciano, diluire il liquido rovesciato con acqua prima di asciugarlo con un panno.

F. Le superfici di lavoro, i pipettatori e le altre apparecchiature devono essere decontaminati regolarmente con una soluzione di ipoclorito di sodio al 2,5% - 3,5% (da 0,35 M a 0,5 M) (vedere *Note procedurali*).

G. Per ridurre al minimo la contaminazione da ampliconi nel dosaggio, si raccomanda caldamente di disporre di un’area separata per la post-amplificazione. Quest’area dedicata dovrebbe essere lontana dall’area di pre-amplificazione, dove hanno luogo la preparazione del reagente, la cattura del target e l’amplificazione.

H. Per contribuire ad evitare la contaminazione da ampliconi del laboratorio, disporre le aree secondo un flusso di lavoro unidirezionale, dalla preparazione dei reagenti fino alla post-amplificazione. Campioni, apparecchiature e reagenti non devono essere riportati nell’area in cui è stata eseguita una fase procedurale precedente. Il personale non deve ritornare nelle aree di lavoro precedenti senza adottare adeguate misure di salvaguardia contro la contaminazione.

Pertinenti ai campioni

I. Dopo l’aggiunta dell’urina, il livello del liquido nella provetta di trasporto del campione di urina deve rientrare inizialmente fra le due righe nere indicatrici marcate sull’etichetta della provetta. In caso contrario, il campione va rifiutato.

J. Mantenere le corrette condizioni di conservazione durante la spedizione del campione, per assicurarne l’integrità. La stabilità del campione in condizioni di spedizione diverse da quelle raccomandate non è stata determinata.

K. Le date di scadenza indicate sui kit di raccolta si riferiscono al centro di raccolta e non al laboratorio di analisi. I campioni raccolti in qualsiasi momento prima della data di scadenza indicata nel kit di raccolta, e che siano trasportati e conservati seguendo le istruzioni del foglietto illustrativo della confezione, sono validi per l’analisi anche se la data di scadenza della provetta di raccolta è passata.

L. Conservare tutti i campioni alle temperature specificate. L'uso di campioni conservati in modo erroneo può influire sulle prestazioni del dosaggio. Vedere *Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni* per istruzioni specifiche.

M. I campioni di urina potrebbero essere infettivi. Nell'eseguire questo dosaggio, adottare le precauzioni universali. Metodi adeguati di manipolazione e smaltimento vanno stabiliti dal direttore del laboratorio. Questa procedura va svolta solo da personale adeguatamente qualificato e competente nell'uso del PROGENSA PCA3 Assay, e adeguatamente addestrato nella manipolazione di materiali infettivi.

N. Evitare la contaminazione crociata durante i procedimenti di manipolazione dei campioni. I campioni di urina possono contenere livelli elevati di RNA target. Assicurarsi che i contenitori dei campioni non vengano in contatto tra di loro ed eliminare i materiali usati senza farli passare sopra i contenitori aperti. Se i guanti entrano in contatto con un campione, cambiarli per evitare la contaminazione incrociata.

Pertinenti al dosaggio

O. Non usare il kit dopo la data di scadenza.

P. **Per il kit PROGENSA PCA3 Assay, non scambiare, mescolare o combinare reagenti del dosaggio PCA3 provenienti da kit con numeri di lotto diversi**; ciò significa che, per ciascun analita, i reagenti per dosaggio nella scatola refrigerata e in quella a temperatura ambiente devono provenire dallo stesso lotto. I reagenti del dosaggio possono essere usati con kit di calibratori e controlli provenienti da lotti diversi. I kit di liquidi per dosaggio APTIMA sono interscambiabili. I kit di reagenti PCA3 e PSA non devono obbligatoriamente essere abbinati l'uno con l'altro.

Q. Conservare tutti i reagenti del dosaggio alle temperature specificate. L'uso di reagenti conservati in modo erroneo può influire sulle prestazioni del dosaggio. Vedere *Requisiti di conservazione e manipolazione* e *Note procedurali* per istruzioni specifiche.

R. Per la disattivazione del dosaggio (vedere *Procedura di analisi*), la concentrazione minima dell'ipoclorito di sodio deve essere del 2,5% (0,35 M) **dopo** la diluizione 1:1 con il tampone di disattivazione. Pertanto, la soluzione di ipoclorito di sodio di partenza deve avere una concentrazione compresa tra il 5% e il 7% (da 0,7 M a 1,0 M) per raggiungere la concentrazione finale richiesta per la disattivazione.

S. Usare puntali con tappi idrofobi. A questo dosaggio vanno dedicati almeno due pipettatori a ripetizione: uno da usare per le fasi di pre-amplificazione e uno per le fasi di post-amplificazione. A meno che non si usi lo strumento TECAN Freedom EVO 100/4, occorre dedicare un micropipettatore al trasferimento dei campioni. Tutti i pipettatori vanno puliti regolarmente come descritto nelle *Note procedurali*.

T. Quando si usano pipettatori a ripetizione per l'aggiunta dei reagenti, non toccare la provetta di reazione con il puntale del pipettatore, onde evitare il carryover da una provetta all'altra.

U. Per ottenere risultati accurati del dosaggio occorre una miscelazione adeguata. Per dettagli completi, vedere *Note procedurali*.

V. Ai procedimenti di pre-amplificazione, amplificazione e post-amplificazione vanno dedicati bagni di acqua separati.

W. Alcuni reagenti di questo kit presentano etichette con simboli di rischio e sicurezza, in osservanza della Direttiva europea 1999/45/CE, e vanno manipolati di conseguenza. Schede sulla sicurezza dei materiali possono essere visualizzate presso il sito www.gen-probe.com e sono disponibili dietro richiesta.

Requisiti di conservazione e manipolazione

A. Per informazioni sulla conservazione dei reagenti, consultare la Tabella 1.

Tabella 1: Conservazione dei reagenti

Reagente/Liquido	Conservazione dei prodotti non aperti	Aperti/Ricostituiti Stabilità (fino alla data di scadenza)
Reagenti di amplificazione	2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza	30 giorni a 2 °C - 8 °C*
Reagenti sonda	2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza	30 giorni a 2 °C - 8 °C*
Reagente enzimatico	2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza	30 giorni a 2 °C - 8 °C*
Reagenti Target Capture	15 °C - 30 °C fino alla data di scadenza	30 giorni a 15 °C - 30 °C
Soluzione di ricostituzione amplificazione	2 °C - 30 °C fino alla data di scadenza	N/P (monouso)
Soluzione di ricostituzione sonda	2 °C - 30 °C fino alla data di scadenza	N/P (monouso)
Soluzione di ricostituzione enzimi	2 °C - 30 °C fino alla data di scadenza	N/P (monouso)
Reagente di selezione	2 °C - 30 °C fino alla data di scadenza	30 giorni a 15 °C - 30 °C
Calibratori	2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza	N/P (seduta singola)
Controlli	2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza	N/P (seduta singola)
Reagente oleoso	15 °C - 30 °C fino alla data di scadenza	30 giorni a 15 °C - 30 °C
Soluzione di lavaggio	15 °C - 30 °C fino alla data di scadenza	30 giorni a 15 °C - 30 °C
Tampone per fluido di disattivazione	15 °C - 30 °C fino alla data di scadenza	28 giorni a 15 °C - 30 °C

*Si può usare di nuovo per altre sedute di dosaggio fino a quattro volte, purché la quantità totale di tempo in cui resta a temperatura ambiente non sia superiore alle 24 ore.

B. **Non conservare il reagente Target Capture a temperature inferiori a 15 °C.**

C. Il reagente sonda e il reagente sonda ricostituito sono fotosensibili. Proteggere questi reagenti da una prolungata esposizione alla luce durante il magazzinaggio e la preparazione all'uso.

D. **Non congelare i reagenti.**

E. Non usare i reagenti né i liquidi dopo la data di scadenza.

F. I calibratori ed i controlli PROGENSA PCA3 e PSA sono flaconi da utilizzare per un'unica seduta e vanno smaltiti dopo l'uso.

G. Cambiamenti nell'aspetto fisico del reagente fornito possono indicare instabilità o deterioramento di questi materiali. Se si notano cambiamenti nell'aspetto fisico dei reagenti una volta che siano stati rimessi in sospensione (per es. evidenti cambiamenti nel colore o nella torbidità del reagente indicativi di contaminazione microbica), contattare l'Assistenza tecnica Gen-Probe prima dell'uso.

H. Eliminare il reagente ricostituito dopo 30 giorni o entro la data di scadenza, a seconda di quale data cada per prima.

I. Avanzi di reagenti aperti o ricostituiti possono essere usati in dosaggi successivi se sono stati conservati adeguatamente dopo l'uso iniziale. Il reagente avanzato può essere unito a reagenti appena preparati o ad altri reagenti avanzati dello stesso lotto. **Non scambiare, mescolare o combinare reagenti provenienti da kit con numeri di lotto diversi** (vedere *Avvertenze e precauzioni*). Nessun componente del reagente raggruppato può superare i limiti di conservazione dei reagenti aperti o ricostituiti. Assicurarsi che il reagente raggruppato sia stato miscelato accuratamente e che sia stato preparato un volume sufficiente a fornire abbastanza reagente per un'intera seduta di dosaggio.

Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni

Il PROGENSA PCA3 Assay è concepito per la quantificazione dell'RNA di PCA3 e PSA nell'urina di primo getto raccolta dopo un DRE consistente in tre pressioni per ciascun lobo. L'urina viene trattata usando il PROGENSA PCA3 Urine Specimen Transport Kit. La stabilità dell'RNA di PCA3 e PSA nell'urina e nell'urina trattata è stata stabilita monitorando i livelli delle copie di RNA nei campioni di urina raccolti seguendo le istruzioni indicate sotto.

A. Istruzioni per la raccolta e il trattamento dei campioni di urina:

1. Si consiglia di chiedere al paziente di bere una grande quantità d'acqua (circa 500 ml) per essere certi di ottenere una quantità di urina sufficiente per la raccolta.
2. Subito prima della raccolta di urina, eseguire un esame digito-rettale (DRE) come descritto sotto:

   Applicare pressione sulla prostata, abbastanza da comprimere la superficie di circa 1 cm, dalla base all'apice e dalla linea laterale a quella mediana per ciascun lobo, come illustrato nella Figura 1. Eseguire esattamente tre pressioni per ciascun lobo. Questa operazione non va intesa come un massaggio prostatico.

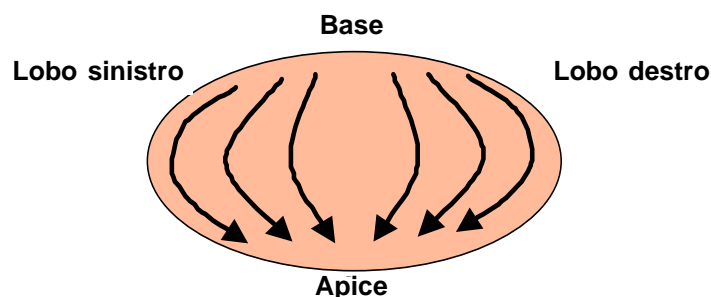



Figura 1. Giusta direzione della pressione applicata alla prostata

3. Dopo il DRE, chiedere al paziente di raccogliere l'urina di primo getto (circa 20-30 ml del getto di urina iniziale) in una coppetta per raccolta adeguatamente etichettata. Deve essere il campione di urina del primo getto successivo al DRE. Usare una coppetta per raccolta priva di qualsiasi conservante. Se un paziente non riesce a interrompere il flusso di urina e fornisce una quantità di urina superiore ai primi 20-30 ml richiesti, conservare l'intero volume fornito. Se il paziente non è in grado di fornire il volume di urina richiesto, si tenga presente che per eseguire il PROGENSA PCA3 Assay sono necessari almeno 2,5 ml di urina. In caso contrario, il campione va rifiutato.

   ***Nota -** Volumi di urina molto grandi possono abbassare le concentrazioni degli analiti PCA3 e PSA e più raramente possono rendere il campione non valido. Per questo motivo, il paziente dovrebbe evitare di riempire la coppetta per la raccolta dell'urina.*

4. **I campioni di urina non trattati, se non vengono trattati immediatamente, devono essere mantenuti ad una temperatura compresa fra 2 °C e 8 °C, oppure conservati sotto ghiaccio. Il campione di urina raffreddato e non trattato va trasferito nella provetta di trasporto del campione di urina entro 4 ore dalla raccolta. In caso contrario, il campione va rifiutato e occorre raccogliere un nuovo campione. Non congelare i campioni di urina non trattati.**

5. Per trattare i campioni di urina, chiuderli bene e capovolgerli 5 volte per rimettere le cellule in sospensione. Togliere il tappo della provetta di trasporto del campione di urina e poi, con la pipetta di trasferimento monouso fornita, trasferire nella provetta 2,5 ml di urina raccolta. Il giusto volume di urina sarà stato aggiunto quando il livello del liquido si troverà fra le righe di riempimento nere stampate sull'etichetta della provetta di trasporto del campione di urina.
6. Richiudere bene il tappo sulla provetta di trasporto del campione di urina e capovolgere 5 volte il campione per miscelarlo. Questo sarà ora il campione di urina trattato.

B. Trasporto e conservazione dei campioni prima dell'analisi:

1. I campioni di urina trattati devono essere trasportati al laboratorio nella provetta di trasporto del campione di urina. La spedizione dei campioni può avvenire in condizioni ambientali non controllate (senza controllo della temperatura) o in fase di congelamento. Devono essere prese disposizioni per il trasporto per assicurare che i campioni vengano ricevuti presso il laboratorio di analisi entro 5 giorni dalla raccolta.

   Una volta ricevuto il campione, il laboratorio deve verificarne la data di raccolta riportata sulla provetta. Se i campioni sono stati spediti in condizioni ambientali non controllate e sono stati ricevuti dopo più di 5 giorni dalla raccolta, dovranno essere rifiutati e occorrerà richiedere nuovi campioni. Il laboratorio può conservare i campioni ad una temperatura compresa fra 2 °C e 8 °C per un massimo di 14 giorni. Dopodiché il campione dovrà essere smaltito. Se sono necessari periodi più lunghi, consultare la Tabella 2 in cui sono riportati i tempi di conservazione consentiti a diverse temperature.

   Tabella 2: Durata di conservazione dei campioni di urina trattati

Temperatura di conservazione	Tempi
Conservazione e spedizione dei campioni trattati:	fino a 5 giorni*
Dopo la ricezione presso il laboratorio di analisi:	
da 2 °C a 8 °C	fino a 14 giorni
da -35 °C a -15 °C	fino a 11 mesi**
a -65 °C o temperatura inferiore	fino a 36 mesi**

*Tempo consentito per la spedizione in condizioni ambientali non controllate o in fase di congelamento.

**Tempo consentito dopo la conservazione in fase di congelamento.

2. I campioni di urina trattati possono essere sottoposti al massimo a 5 cicli di congelamento-scongelamento.

C. Conservazione dei campioni dopo l'analisi:

1. I campioni analizzati devono essere conservati su una rastrelliera, in posizione verticale.
2. Le provette di trasporto dei campioni di urina, se non vengono richiuse con un tappo intatto, vanno coperte con una nuova barriera pulita di plastica o alluminio.
3. Se i campioni analizzati devono essere congelati o spediti, rimuovere i tappi perforabili e sostituirli con nuovi tappi non perforabili sulle provette di trasporto del campione. Qualora sia necessario inviare i campioni presso altri laboratori di analisi, è necessario mantenerli alle temperature consigliate. **Evitare schizzi e contaminazione incrociata.**

Nota - *La spedizione dei campioni deve essere effettuata in conformità ai regolamenti applicabili relativi al trasporto nazionale e internazionale.*

Procedura di analisi

A. Preparazione dell'area di lavoro

1. Regolare un bagno di acqua su 62 °C ± 1 °C per la pre-amplificazione, un secondo bagno di acqua su 42 °C ± 1 °C per l'amplificazione ed un terzo su 62 °C ± 1 °C per la post-amplificazione. Assicurarsi che i bagni di acqua contengano una quantità d'acqua sufficiente (vedere *Note procedurali*). Se si usa l'SB100 Dry Heat Bath/Vortexer, consultare la *Scheda applicativa dell'SB100 Dry Heat Bath/Vortexer per il PROGENSA PCA3 Assay* (*Scheda applicativa dell'SB100*).
2. Prima di iniziare il dosaggio, pulire le superfici di lavoro e i pipettatori con una soluzione di ipoclorito di sodio al 2,5% - 3,5% (da 0,35 M a 0,5 M). Lasciare la soluzione di ipoclorito di sodio a contatto con le superfici e i pipettatori per almeno 1 minuto, quindi risciacquare con acqua. Non lasciare asciugare la soluzione di ipoclorito di sodio. Coprire la superficie del banco sul quale verrà eseguita l'analisi con teli da banco di laboratorio puliti, assorbenti e plastificati.
3. Disporre nel sistema di cattura del target (TCS) un numero sufficiente di vassoi con dieci puntali. Assicurarsi che il flacone di lavaggio del TCS sia pieno di soluzione di lavaggio e che l'aspiratore sia collegato alla pompa di aspirazione. (Consultare il *Manuale d'uso del sistema di cattura del target*.)

B. Ricostituzione e preparazione dei reagenti

Prima di iniziare il trasferimento dei campioni, occorre eseguire la ricostituzione dei reagenti.

1. Per ricostituire i reagenti di amplificazione, enzimatico e sonda, unire il contenuto dei flaconi di reagente liofilizzato alla soluzione di ricostituzione. Se le soluzioni di ricostituzione sono state refrigerate, prima dell'uso lasciare che raggiungano la temperatura ambiente.

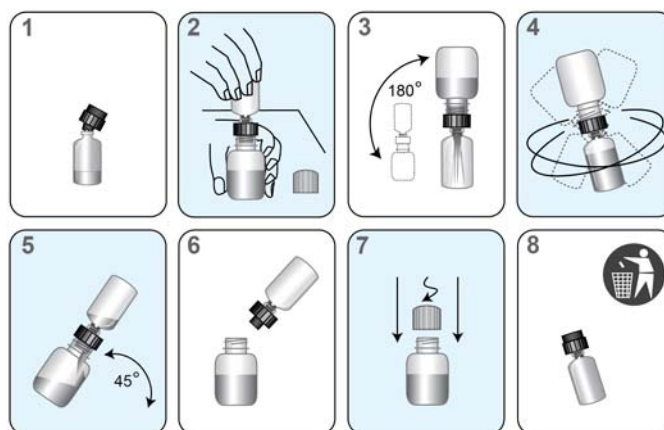



Figura 2. Processo di ricostituzione

a. Abbinare l'appropriata soluzione di ricostituzione al suo reagente liofilizzato. Verificare che i flaconi abbiano etichette dello stesso colore per assicurarsi che siano abbinati correttamente.
b. Aprire il flacone del reagente liofilizzato e inserire con fermezza l'estremità indentata del collare di ricostituzione nell'apertura del flacone (Figura 2, Passaggio 1).

c. Aprire il flacone della soluzione di ricostituzione corrispondente e disporne il tappo su una superficie di lavoro pulita e coperta. Tenendo il flacone della soluzione sul banco, inserire con fermezza l'altra estremità del collare di ricostituzione nell'apertura del flacone (Figura 2, Passaggio 2).
d. Capovolgere lentamente la bottiglia con il flacone collegato. Lasciar drenare la soluzione dal flacone alla fiala di vetro (Figura 2, Passaggio 3). Attendere che il reagente liofilizzato vada in soluzione, quindi agitare ruotando delicatamente la soluzione nel flacone di vetro per miscelarla. Nel roteare il flacone, evitare la formazione di schiuma (Figura 2, Passaggio 4).
e. Capovolgere il gruppo e inclinarlo ad un angolo di 45° per ridurre al minimo la formazione di schiuma (Figura 2, Passaggio 5). Lasciare che tutto il liquido ritorni nella bottiglia di plastica.
f. Rimuovere il collare di ricostituzione e la fiala di vetro (Figura 2, Passaggio 6).
g. Richiudere il flacone di plastica (Figura 2, Passaggio 7). Annotare le iniziali dell'operatore e la data di ricostituzione su tutte le fiale di reagente ricostituito. Assicurarsi di annotare l'analita (PCA3 o PSA) sui flaconi del reagente sonda.
h. Gettare via sia il collare di ricostituzione che la fiala di vetro (Figura 2, Passaggio 8).

2. I reagenti sonda, di amplificazione ed enzimatici precedentemente ricostituiti devono essere portati a temperatura ambiente (da 15 °C a 30 °C) prima di iniziare il dosaggio. Se si raggruppano reagenti avanzati, consultare *Requisiti di conservazione e manipolazione*. Se il reagente di amplificazione ricostituito contiene precipitato che non rientra in soluzione a temperatura ambiente, riscaldarlo a 62 °C ± 1 °C per 1-2 minuti nell'area di pre-amplificazione. Se il reagente sonda ricostituito contiene precipitato che non rientra in soluzione a temperatura ambiente, riscaldarlo a 62 °C ± 1 °C per 1-2 minuti nell'area di post-amplificazione. Dopo questi procedimenti di riscaldamento, i reagenti ricostituiti possono essere usati anche se resta del precipitato residuo. Dopo la risospensione, miscelare i flaconi capovolgendoli delicatamente.

C. Preparazione delle rastrelliere

Il pipettatore a ripetizione usato nella cattura del target, nel trasferimento dei campioni e nell'amplificazione deve essere dedicato per l'uso solo in questi passaggi (vedere *Avvertenze e precauzioni*).

1. Approntare una rastrelliera per l'analita PCA3 ed un'altra rastrelliera per l'analita PSA.

   ***Nota -** Se il numero di campioni è abbastanza basso, entrambi gli analiti possono essere analizzati in un'unica rastrelliera. Se si usa lo strumento TECAN Freedom EVO 100/4, per ciascun analita va usata una rastrelliera separata. Non si possono analizzare più di due rastrelliere complete (20 TTU) alla volta.*

2. Nella/e rastrelliera/e per unità a dieci provette (TTU), disporre abbastanza TTU da poter alloggiare i calibratori, i controlli ed i campioni per ciascun analita.
3. Etichettare le TTU con gli ID campione. La Tabella 3 descrive l'aggiunta di calibratori, controlli e campioni. Avviare i calibratori PSA su una nuova TTU.

   ***Nota -** I calibratori vanno eseguiti in tre replicati ed i controlli in due replicati ciascuno, e devono essere eseguiti sulla stessa rastrelliera dei campioni. I campioni vanno eseguiti in replicato. Non lasciare tubi di reazione vuoti fra calibratori, controlli e campioni. Se si usa lo strumento TECAN Freedom EVO 100/4, consultare la Scheda applicativa del TECAN Freedom EVO 100/4 per il PROGENSA PCA3 Assay (Scheda applicativa del TECAN Freedom EVO) per ulteriori istruzioni.*

Tabella 3: Esempio di approntamento di rastrelliera

Rastrelliera Posizione	Campione Descrizione	*Concentrazione PCA3 target (copie/ml)	*Concentrazione PSA target (copie/ml)
da 1 a 3	Calibratore 1	0	0
da 4 a 6	Calibratore 2	250	7500
da 7 a 9	Calibratore 3	2500	75.000
da 10 a 12	Calibratore 4	25.000	750.000
da 13 a 15	Calibratore 5	125.000	3.000.000
da 16 a 17	Controllo A	1250	37.500
da 18 a 19	Controllo B	62.500	1.500.000
da 20 a n	Campione clinico	sconosciuto	sconosciuto

*Calibratori e controlli positivi di PCA3 e PSA hanno valori assegnati, quindi i valori effettivi di copie/ml per i calibratori da 2 a 5 e per i controlli A e B saranno leggermente diversi dalle concentrazioni target indicate nella tabella e varieranno da un lotto all'altro. Le informazioni sulla concentrazione vengono fornite su una scheda contenuta nella confezione delle fiale di calibratore e controllo e sono usati per la calibrazione e per la determinazione della validità della seduta.

D. Verifica delle informazioni sulle concentrazioni

Verificare con l'amministratore di sistema del PROGENSA PCA3 Assay Software che siano state immesse le informazioni sulle concentrazioni per i lotti dei kit di calibratori e controlli PROGENSA PCA3 e PSA analizzati. Per ulteriori informazioni, consultare la *Guida di riferimento rapido per il PROGENSA PCA3 Assay* (*Guida di riferimento rapido*) o il *Manuale d'uso dell'amministratore di sistema del PROGENSA PCA3 Assay Software*.

Nota - *Si richiede l'immissione delle informazioni sulle concentrazioni* ***prima dell'uso iniziale*** *di ciascun nuovo lotto di kit di calibratori e controlli. Le sedute successive che impiegano calibratori e controlli derivanti dallo stesso lotto di kit non richiedono ulteriore azione.*

E. Approntamento del Worklist Editor

Generare una lista di lavoro per la seduta del dosaggio usando il GEN-PROBE Worklist Editor su un computer situato nell'area di pre-amplificazione. Per l'uso del Worklist Editor, consultare la *Guida di riferimento rapido* o il *Manuale d'uso del GEN-PROBE Worklist Editor*. Se si usa lo strumento TECAN Freedom EVO 100/4, consultare anche la *Scheda applicativa del TECAN Freedom EVO* per ulteriori istruzioni.

F. Preparazione dei campioni

1. Prima dell'analisi, lasciare che calibratori e controlli raggiungano la temperatura ambiente. Miscelare i flaconi capovolgendoli delicatamente.
2. Prima dell'analisi, lasciare che i campioni raggiungano la temperatura ambiente. **Non mettere i campioni nel vortex.** I campioni vanno miscelati mediante capovolgimento occasionale e delicato durante il periodo di riscaldamento. Vedere le *Note procedurali* per informazioni sul precipitato che non torna in soluzione e sulla manipolazione dei campioni congelati.

G. Pre-amplificazione

L'ambiente di pre-amplificazione deve trovarsi a temperature comprese fra 15 °C e 30 °C. Analizzare in parallelo entrambe le rastrelliere. Se si usa l'SB100 Dry Heat Bath/Vortexer, consultare la *Scheda applicativa dell'SB100.* Se si usa lo strumento

TECAN Freedom EVO 100/4, consultare la *Scheda applicativa del TECAN Freedom EVO* per ulteriori istruzioni.

1. Miscelare accuratamente il reagente Target Capture (TCR) mediante inversione o con movimento rotatorio. Usando il pipettatore a ripetizione, aggiungere 100 µl di TCR specifico dell'analita alla provetta di reazione appropriata.
2. Forare il tappo del flacone del calibratore con il micropipettatore e aggiungere 400 µl del calibratore alla provetta di reazione appropriatamente etichettata. Usando lo stesso puntale di pipetta, prelevare aggiunte di replicato dal flacone attraverso il tappo forato. Usare nuovi puntali di pipetta per ciascun flacone di calibratore. Ripetere per l'aggiunta di controlli e campioni. Coprire e salvare eventuali campioni avanzati e conservarli ad una temperatura di 8 °C o inferiore (vedere *Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni* per ulteriori informazioni) nel caso fosse necessario ripetere l'analisi.
3. Coprire le TTU con i fogli sigillanti e agitare delicatamente a mano la rastrelliera. **Non metterla sul vortex.** Incubare la rastrelliera a 62 °C ± 1 °C in un bagno di acqua per 30 ± 5 minuti.
4. Estrarre la rastrelliera dal bagno di acqua e asciugare il fondo delle provette su un materiale assorbente.
5. Assicurarsi che i fogli sigillanti siano bene alloggiati. Se necessario, sostituirli con altri fogli sigillanti nuovi e sigillare bene le TTU.
6. Agitare la rastrelliera per 60 secondi, mettendola sul miscelatore vortex per unità multiprovetta (vedere *Note procedurali*). Iniziare l'agitazione su vortex entro 2 minuti dalla rimozione della rastrelliera dal bagno di acqua.
7. Senza rimuovere i fogli sigillanti, incubare la rastrelliera a temperatura ambiente per 30 ± 5 minuti.
8. Mettere la rastrelliera sulla base magnetica del TCS per 5-10 minuti, con la linguetta frontale rivolta in avanti. Caricare la rastrelliera per TTC con i TTC.
9. Eseguire il priming delle linee della pompa della stazione di dispensazione pompando la soluzione di lavaggio attraverso il collettore di dispensazione. Pompare attraverso il sistema liquido sufficiente per eliminare le bolle d'aria dalla linea e per erogare da tutti e 10 i beccucci un flusso costante di liquido.
10. Accendere la pompa di aspirazione e scollegare il collettore di aspirazione in corrispondenza del primo connettore fra l'aspiratore e il flacone di cattura. Assicurarsi che il vacuometro sia conforme alle specifiche delle prove di rilevamento delle perdite. Possono essere necessari 15 secondi per ottenere questa lettura. Ricollegare il collettore e assicurarsi che il vacuometro soddisfi le specifiche di livello del vuoto. Lasciare accesa la pompa di aspirazione fino a quando tutti i passaggi di cattura del target sono completati e il collettore di aspirazione è asciutto.

    Consultare la scheda delle specifiche di aspirazione del Sistema Target Capture, situata sul retro del *Manuale d'uso del Sistema Target Capture* o contattare l'Assistenza tecnica Gen-Probe per ulteriori informazioni.
11. Collegare saldamente il collettore di aspirazione alla prima serie di puntali. Abbassare i puntali nella prima TTU fino a quando non entrino a contatto con la sommità del liquido. Mantenere il contatto dei puntali con la sommità del liquido mentre si muovono verso il basso, finché non entrino brevemente a contatto con il fondo delle provette. Picchiettare delicatamente i puntali contro il fondo delle provette fino ad espellere tutto il liquido residuo. Non tenere i puntali a contatto prolungato con il fondo delle provette né picchiettare i puntali rapidamente, poiché ciò potrebbe causare un'eccessiva formazione di schiuma nel contenitore di cattura sotto vuoto.

12. Al termine dell'aspirazione, espellere i puntali nel rispettivo vassoio originale portapuntali. Ripetere i passaggi di aspirazione per le TTU restanti, usando per ogni provetta di reazione un puntale dedicato.
13. Disporre il collettore di dispensazione sopra ciascuna TTU e, usando la pompa della stazione di dispensazione, erogare 1,0 ml di soluzione di lavaggio in ciascuna provetta della TTU.
14. Coprire le provette con un foglio sigillante e rimuovere la rastrelliera dal TCS. Agitare una volta sul miscelatore vortex per unità multiprovetta. Per ulteriori informazioni, vedere *Note procedurali*.
15. Disporre la rastrelliera sulla base magnetica del TCS per 5-10 minuti.
16. Aspirare tutto il liquido come descritto nei Fasi 11 e 12.
17. Dopo l'aspirazione finale, togliere la rastrelliera dalla base magnetica del TCS e ispezionare visivamente le provette per assicurarsi che tutto il liquido sia stato aspirato e che tutte le provette contengano pellet di microparticelle magnetiche. Se si vede del liquido, disporre di nuovo la rastrelliera sulla base del TCS per 2 minuti e ripetere l'aspirazione per quella TTU usando gli stessi puntali usati in precedenza per ciascuna provetta di reazione. Se una volta completata l'aspirazione è visibile QUALSIASI pellet di particelle magnetiche, la provetta può essere accettata. Se non è visibile alcun pellet, il campione va risottoposto ad analisi. Se lo stesso campione non contiene un pellet di particelle magnetiche a questo stadio di una seduta successiva, questo potrebbe indicare un problema specifico del campione. In questo caso si consiglia di fare una seconda raccolta del campione di urina.

H. Amplificazione

Nota - *L'aggiunta di enzima ad una rastrelliera di reazione (Fasi 6 e 7 qui sotto) va eseguita entro 90 secondi al massimo.*

Eseguire i Fasi 6 e 7 su una rastrelliera prima di ripeterli sulla seconda. Se si usa l'SB100 Dry Heat Bath/Vortexer, consultare la *Scheda applicativa dell'SB100*. Se si usa lo strumento TECAN Freedom EVO 100/4, consultare la *Scheda applicativa del TECAN Freedom EVO* per ulteriori istruzioni.

1. Usando il pipettatore a ripetizione, aggiungere a ciascuna provetta di reazione 75 µl di reagente di amplificazione ricostituito specifico per l'analita. Tutte le miscele di reazione nella rastrelliera devono essere ora di colore rosso.
2. Usando il pipettatore a ripetizione, aggiungere 200 µl di reagente oleoso.
3. Coprire le provette con un foglio sigillante e agitarle su un miscelatore vortex per unità multiprovetta.
4. Incubare la rastrelliera nel bagno di acqua di pre-amplificazione a 62 °C ± 1 °C per 10 ± 5 minuti.
5. Trasferire la rastrelliera in un bagno di acqua a 42 °C ± 1 °C per 5 ± 2 minuti.
6. Con la rastrelliera nel bagno di acqua, togliere delicatamente il foglio sigillante e poi, usando il pipettatore a ripetizione, aggiungere 25 µl del reagente enzimatico ricostituito a ciascuna delle miscele di reazione. Tutte le reazioni dovrebbero ora essere di colore arancio.
7. Coprire immediatamente le provette con un nuovo foglio sigillante, rimuoverle dal bagno di acqua e miscelare rapidamente le reazioni agitando delicatamente la rastrelliera con la mano.

   Nota - *Ridurre al minimo il periodo di tempo in cui la rastrelliera si trova fuori dal bagno di acqua, onde evitare il raffreddamento delle provette.*

8. Incubare la rastrelliera a 42 °C ± 1 °C per 60 ± 5 minuti.

I. Post-amplificazione

Il pipettatore a ripetizione usato nell'ibridizzazione e nella selezione va dedicato esclusivamente a questi passaggi (vedere *Avvertenze e precauzioni*). L'ambiente di post-amplificazione, incluso il rilevamento, deve essere a 15 °C - 30 °C. Se si usa l'SB100 Dry Heat Bath/Vortexer, consultare la *Scheda applicativa dell'SB100.*

1. Ibridazione
    a. Togliere la rastrelliera dal bagno di acqua di pre-amplificazione e trasferirla nella zona di post-amplificazione. Aggiungere 100 µl del reagente sonda specifico dell'analita ricostituito, usando il pipettatore a ripetizione. Tutte le miscele di reazione dovrebbero ora essere di colore giallo.
    b. Coprire le provette con un foglio sigillante e agitarle per 10 secondi o fino ad ottenere un colore uniforme, sul miscelatore vortex per unità multiprovetta.
    c. Incubare la rastrelliera in un bagno di acqua a 62 °C ± 1 °C per 20 ± 5 minuti.
    d. Togliere la rastrelliera dal bagno di acqua e incubarla a temperatura ambiente per 5 ± 1 minuti.
2. Selezione
    a. Usando il pipettatore a ripetizione, aggiungere a ciascuna provetta 250 µl di reagente di selezione. Tutte le reazioni dovrebbero ora essere di colore rosa.
    b. Coprire le provette con un foglio sigillante, agitare su vortex per 10 secondi o fino ad ottenere un colore uniforme, e incubare la rastrelliera in un bagno di acqua a 62 °C ± 1 °C per 10 ± 1 minuti.
    c. Togliere la rastrelliera dal bagno di acqua. Incubarla a temperatura ambiente per 15 ± 3 minuti.

J. Rilevamento

Per l'uso del LEADER HC+ Luminometer, consultare il *Manuale d'uso del LEADER HC+ Luminometer*. Per l'uso del PROGENSA PCA3 Assay Software, consultare la *Guida di riferimento rapido* o il *Manuale d'uso e il Manuale dell'amministratore di sistema del PROGENSA PCA3 Assay Software*.

1. Preparare il LEADER HC+ Luminometer mettendo una TTU vuota nella posizione di vassoio numero 1 ed eseguendo una volta il protocollo di WASH (lavaggio).
2. Assicurarsi di avere a disposizione volumi sufficienti di Auto Detect 1 e 2 per completare le reazioni.
3. Caricare le TTU nel luminometro usando come guida il diagramma nel luminometro. Se si analizzano entrambi gli analiti (seduta consecutiva), caricare prima tutte le TTU PCA3, seguite immediatamente da tutte le TTU PSA.
4. Eseguire l'accesso al computer. Fare clic su **NEW RUN** (nuova seduta) e selezionare il protocollo e le concentrazioni appropriati per il dosaggio. Fare clic su **NEXT** (avanti) per iniziare la seduta.

    Nota - *La seduta deve essere completata entro 2 ore dal termine dell'incubazione della fase di selezione a 62 °C.*
5. Preparare un liquido di disattivazione miscelando in un contenitore di plastica con coperchio grande volumi uguali di soluzione di ipoclorito di sodio in concentrazioni dal 5% al 7% (da 0,7 M a 1,0 M) e tampone per liquido di disattivazione. Etichettare e scrivere la data di scadenza sul contenitore di plastica. Il liquido di disattivazione è stabile per 4 settimane a temperatura ambiente.

6. Al termine della seduta, il software del dosaggio genera due referti sulla seduta, un referto dei dati grezzi sulla seduta e un referto dei rapporti, se le sedute sono consecutive (vedere *Procedure di controllo della qualità* e *Interpretazione dei risultati*).
7. Al termine della seduta, togliere le TTU usate dal luminometro e disporle nel contenitore con il liquido di disattivazione. Lasciare le TTU nel contenitore per almeno 15 minuti prima dello smaltimento. Metodi adeguati di manipolazione e smaltimento vanno stabiliti dal direttore del laboratorio.

Note procedurali

A. Preparazione dei campioni

1. Se i campioni contengono precipitati in sospensione, riscaldarli a 37 °C per un massimo di 5 minuti e capovolgerli poi delicatamente. Nel caso in cui il precipitato non rientri in soluzione, assicurarsi che non impedisca l'erogazione del campione.
2. I campioni congelati vanno scongelati a temperatura ambiente (da 15 °C a 30 °C, si può usare un bagno di acqua) con capovolgimento occasionale durante lo scongelamento per prevenire la formazione di un tappo non solubile. Miscelare i flaconi capovolgendoli delicatamente quando il ghiaccio all'interno del flacone si è sciolto abbastanza da staccarsi e si può muovere liberamente. Continuare il riscaldamento finché il campione non risulta completamente scongelato e miscelare di nuovo i flaconi capovolgendoli delicatamente.
   a. Se si forma un tappo e i campioni verranno pipettati con lo strumento TECAN Freedom EVO 100/4, ricongelare il campione, ripetere le istruzioni di scongelamento e assicurarsi che non si formi un tappo. Se non si riesce a eliminare il tappo, il campione deve essere pipettato a mano.
   b. Se si forma un tappo e i campioni vengono pipettati a mano con un micropipettatore, non occorre fare altro che assicurarsi che il tappo non impedisca l'erogazione del campione.

B. Pipettazione di controlli, calibratori e campioni

1. Il volume del calibratore, del controllo o del campione aggiunti alla TTU dovrebbe essere di 400 µl. Si consiglia l'ispezione visiva del volume pipettato nella TTU per assicurare un corretto trasferimento di volume. Per ottenere risultati accurati occorre un volume appropriato.
2. Assicurarsi che il puntale della pipetta sia alloggiato correttamente sul pipettatore e che l'impostazione del volume sia corretta. Si raccomanda di controllare visivamente l'impostazione del volume al termine di ciascuna TTU (ogni 10 provette). Rilasciare lentamente e a velocità costante lo stantuffo della pipetta quando si aspira il campione, per evitare che si formino schiuma e bolle.

C. Reagenti

1. Durante la conservazione, la soluzione di ricostituzione del reagente sonda potrebbe creare precipitato. Riscaldare la soluzione a 62 °C ± 1 °C per 1-2 minuti. Al termine di questa fase di riscaldamento, la soluzione di ricostituzione della sonda può essere utilizzata anche se resta un precipitato residuo. Dopo la risospensione, miscelare capovolgendo con attenzione la fiala.
2. Quando si pipettano reagenti diversi dall'enzima, mirare leggermente verso il lato del fondo della provetta di reazione (dove il fondo si curva verso l'alto per incontrare i lati). Quando si pipetta il reagente enzimatico, mirare direttamente verso il centro della provetta di reazione. Confermare visivamente che i reagenti vengano distribuiti correttamente (senza una quantità eccessiva di reagente sui lati delle provette e con un adeguato viraggio del colore).

D. Temperatura

1. Le fasi di cattura del target, di amplificazione, di ibridizzazione e di selezione dipendono dalla temperatura. Di conseguenza, è essenziale che i bagni di acqua vengano mantenuti entro gli intervalli di temperature specificati per essi.
2. Per temperatura ambiente si intende un range di temperatura da 15 °C a 30 °C.

E. Tempi

Le reazioni di cattura del target, di amplificazione, di ibridizzazione e di selezione dipendono dai tempi. Attenersi ai tempi specifici indicati nella *Procedura di analisi*.

F. Agitazione su vortex

Un'adeguata agitazione su vortex è importante per ottenere buone prestazioni con il PROGENSA PCA3 Assay. Per agitare le reazioni, impostare la velocità del miscelatore vortex per unità multiprovetta sul valore minimo, fissare la rastrelliera e accendere l'alimentazione. Aumentare lentamente la velocità fino a quando il liquido non arriva a metà della provetta. Agitare per 10 secondi, la quantità di tempo indicata, o fino a quando il colore non risulti uniforme. Prima di spegnere il miscelatore vortex per unità multiprovetta e rimuovere la rastrelliera, impostare la velocità sul valore minimo. Le miscele di reazione non devono mai entrare a contatto con i fogli sigillanti.

G. Bagni di acqua

1. Il livello di acqua nei bagni deve essere mantenuto a una profondità compresa tra 3,8 cm e 5,0 cm (tra 1,5 poll. e 2,0 poll.) in base alla misura presa partendo dalla cassetta di metallo di supporto (posta sul fondo del bagno di acqua) fino alla superficie dell'acqua. Questo assicura un adeguato trasferimento del calore.
2. Per evitare la contaminazione incrociata, i bagni di acqua vanno dedicati ad un procedimento specifico nell'ambito del dosaggio.

H. Decontaminazione

1. Superfici e pipettatori

   Le superfici dei banchi del laboratorio e i pipettatori devono essere decontaminati regolarmente con una soluzione di ipoclorito di sodio dal 2,5% al 3,5% (da 0,35 M a 0,5 M). Lasciare la candeggina a contatto con le superfici per almeno 1 minuto, quindi risciacquare con acqua. **Non lasciare asciugare la soluzione di ipoclorito di sodio.** Le soluzioni a base di cloro possono intaccare apparecchiature e metallo. Risciacquare accuratamente con acqua le apparecchiature, onde evitare che vengano intaccate.

2. Collettore di aspirazione del TCS

   Dopo ogni uso:

   a. Allontanare il collettore di dispensazione.
   b. Disporre un nuovo vassoio con dieci puntali (TTC) nell'apposita rastrelliera. Accendere la pompa di aspirazione. Collegare il collettore di aspirazione ai puntali nel TTC. Aspirare l'eventuale soluzione di lavaggio restante nella vaschetta di condizionamento della stazione di dispensazione.
   c. Versare nella vaschetta di condizionamento almeno 100 ml di soluzione di ipoclorito di sodio in concentrazioni comprese fra 0,5% e 0,7% (da 0,07 M a 0,1 M), o se si preferisce fra 2,5% e 3,5% (da 0,35 M a 0,5 M). Aspirare tutta la soluzione attraverso il collettore di aspirazione.
   d. Versare nella vaschetta di condizionamento almeno 100 ml di acqua deionizzata. Aspirare tutta l'acqua attraverso il collettore di aspirazione.

e. Espellere i puntali nel loro TTC originario.
f. Lasciare accesa la pompa di aspirazione finché il tubo del collettore non risulta asciutto, per prevenire il riflusso (circa 3 minuti).
g. Decontaminare le superfici del collettore di aspirazione come descritto in *Unità TCS*.

3. Contenitore degli scarti del TCS

Pulire la bottiglia degli scarti almeno una volta alla settimana o quando risulta piena al 25%, a seconda del caso che si verifichi per primo.

a. Spegnere la pompa di aspirazione e lasciare equalizzare la pressione di aspirazione.
b. Rilasciare i raccordi di scollegamento rapido fra la bottiglia degli scarti e il flacone di traboccamento, e tra la bottiglia degli scarti e il collettore di aspirazione.
c. Rimuovere la bottiglia degli scarti dal contenitore di cattura sotto vuoto.
d. Rimuovere il tappo e aggiungere con cautela 400 ml di soluzione di ipoclorito di sodio in concentrazioni comprese fra 5% e 7% (da 0,7 M a 1,0 M) alla bottiglia degli scarti da 4 l.

***Nota -** Questo procedimento può essere eseguito all'interno di una cappa aspirante per evitare di liberare fumi nel laboratorio.*

e. Chiudere la bottiglia degli scarti e agitarne delicatamente il contenuto con un movimento rotatorio fino a miscelarlo completamente.
f. Lasciare ferma la bottiglia degli scarti per almeno 15 minuti e poi smaltirne il contenuto (scarti).
g. Risciacquare la bottiglia degli scarti con acqua per eliminare eventuali scarti restanti al suo interno.
h. Chiudere la bottiglia degli scarti vuota e metterla nel contenitore di cattura sotto vuoto. Collegare i raccordi di scollegamento rapido al dispositivo TCS. Smaltire con cautela entrambi i guanti.

4. Unità TCS

Pulire le superfici dell'unità TCS, il collettore di aspirazione e i puntali di espulsione del tampone di lavaggio con salviette di carta inumidite di soluzione di ipoclorito di sodio dal 2,5% al 3,5% (da 0,35 M a 0,5 M). Dopo il passaggio con soluzione di ipoclorito di sodio, risciacquare con acqua e poi asciugare completamente le superfici con salviette di carta.

5. Rastrelliere

Immergere le rastrelliere in una soluzione di ipoclorito di sodio dal 2,5% al 3,5% (da 0,35 M a 0,5 M), assicurandosi che siano coperte dalla soluzione. Tenere le rastrelliere immerse per 10 minuti. Un'esposizione più prolungata danneggia le rastrelliere. Risciacquare accuratamente le rastrelliere con acqua e asciugarle completamente con salviette di carta.

I. Contaminazione del dosaggio

1. Se non si presta abbastanza attenzione durante la procedura del dosaggio, potrebbe verificarsi l'introduzione di materiali contaminanti.
2. Le TTU vanno decontaminate nel liquido di disattivazione come descritto nella *Procedura di analisi*. Non riutilizzare le TTU.
3. Eseguire una regolare decontaminazione delle apparecchiature e delle superfici di lavoro, come descritto sopra nella sezione *Decontaminazione*.
4. Come in qualsiasi sistema di reazione, il talco eccessivo in alcuni guanti può causare la contaminazione di provette aperte. Si raccomanda agli operatori di indossare guanti privi di talco.

Procedure di controllo della qualità

A. Validità della seduta

1. Calibratori e controlli vanno analizzati con tutti i dosaggi e sulla stessa rastrelliera come campioni di analisi. Perché una seduta possa essere considerata valida, vanno soddisfatti i seguenti criteri:

   Valore RLU medio del calibratore 2 > valore soglia RLU

   Dove il valore soglia RLU = RLU medio del calibratore 1
   + 1,645 deviazioni standard dei replicati RLU del calibratore 1
   + 1,645 deviazioni standard dei replicati RLU del calibratore 2.

   Recupero medio interpolato del calibratore 5 = 100 ± 30%

   Recupero medio interpolato del controllo A = 100 ± 60%

   Recupero medio interpolato del controllo B = 100 ± 35%

2. Il software PCA3 valuta automaticamente i risultati rispetto ai criteri indicati sopra e referta lo Stato seduta come PASS (superata) se i criteri di validità sono soddisfatti, e come FAIL (non superata) se i criteri di validità non vengono soddisfatti.
3. Se lo Stato seduta è FAIL (non superata), tutti i risultati della prova nella stessa seduta sono non validi per quell’analita e non vanno refertati.
4. Se una seduta è non valida, essa deve essere ripetuta per quell’analita (vedere *Interpretazione dei risultati*). Se la seduta è valida per l’altro analita, quei risultati possono essere usati nell’analisi dei dati con la seduta valida ripetuta del primo analita.

B. Validità dei campioni

Nell’ambito di una seduta valida, i risultati dei singoli campioni possono essere considerati INVALID (non validi) e saranno indicati nel Referto dei dati grezzi sulla seduta (vedere *Interpretazione dei risultati*). Sebbene replicati individuali per un campione possano essere validi, un campione sarà invalidato se la differenza interpolata c/ml fra i replicati supera il 600%. Deve essere ripetuta l’analisi del campione per quell’analita.

Interpretazione dei risultati

A. Tipi di referti

1. Referto dei dati grezzi sulla seduta

   Il Referto dei dati grezzi sulla seduta offre informazioni sulla validità della seduta (PASS (superata) o FAIL (non superata); vedere *Procedure di controllo della qualità*) e sulle singole provette di reazione analizzate con il PROGENSA PCA3 Assay. Se una seduta è non valida (FAIL (non superata)), tutte le provette di quella seduta saranno etichettate come tali. Tuttavia, provette singole possono essere considerate non valide all'interno di una seduta valida (PASS (superata)). Per sedute consecutive (nelle quali vengono analizzati nella stessa seduta entrambi gli analiti PCA3 e PSA), la seduta di un analita può essere non valida mentre quella dell'altro analita è valida.

   In fondo al Referto dei dati grezzi sulla seduta si trova il Sommario delle eccezioni. Per le sedute consecutive in cui le sedute per entrambi gli analiti sono valide, i campioni elencati nel Sommario delle eccezioni potrebbero richiedere la ripetizione dell'analisi di un analita. Sebbene nel Sommario delle eccezioni sia indicato un risultato di PCA3 Score, questo risultato non è considerato refertabile fino a quando non è stato eseguito l'abbinamento manuale ed il risultato non è indicato nel Referto dei rapporti. Se è stato analizzato solo un analita, o se la seduta per un analita non è valida, tutti i campioni analizzati verranno elencati nel Sommario delle eccezioni.

2. Referto dei rapporti

   Il software del dosaggio genera automaticamente un Referto dei rapporti per una seduta consecutiva nella quale le sedute di entrambi gli analiti sono valide. Il software calcola e riporta il PCA3 Score dei campioni nel Referto dei rapporti. I campioni indicati nel Referto dei rapporti o non richiedono ulteriore analisi, oppure entrambi gli analiti devono essere risottoposti ad analisi. I campioni non indicati nel Referto dei rapporti saranno reperibili nella sezione Sommario delle eccezioni del Referto dei dati grezzi sulla seduta.

   Un Referto dei rapporti può essere generato anche dopo l'abbinamento manuale (vedere *Abbinamento manuale* per ulteriori informazioni).

3. Referto di QC

   Il Referto di QC indica i criteri di validità, le concentrazioni assegnate e interpolate ed i recuperi di calibratori e controlli relativi alla seduta del dosaggio. Il referto indica anche i parametri che definiscono la curva di calibrazione di risposta al dosaggio logistica a quattro parametri (3). Per ulteriori informazioni, consultare il *Manuale d'uso del PROGENSA PCA3 Assay Software*.

B. Abbinamento

1. Abbinamento automatico

   Nelle sedute consecutive in cui sono valide le sedute di entrambi gli analiti, il software abbina automaticamente i risultati individuali relativi agli analiti PCA3 e PSA per i campioni e determina il PCA3 Score (se calcolabile). I risultati sono indicati nel Referto dei rapporti o nel Sommario delle eccezioni del Referto dei dati grezzi sulla seduta.

2. Abbinamento manuale

   Quando gli analiti PCA3 e PSA vengono analizzati in diverse sedute, il software non è in grado di determinare automaticamente il PCA3 Score. L'abbinamento

manuale dei risultati relativi agli analiti è necessario per determinare il PCA3 Score o l'intervallo del PCA3 Score (consultare la *Guida di riferimento rapido* o il *Manuale d'uso del PROGENSA PCA3 Assay Software*). L'abbinamento manuale può essere richiesto anche per i risultati che sono indicati nel Sommario delle eccezioni del Referto dei dati grezzi sulla seduta. Dopo l'abbinamento manuale, i PCA3 Score per i campioni abbinati saranno indicati in un nuovo Referto dei rapporti.

C. Interpretazione dei referti

1. PCA3 Score

Nota - Sono refertabili solo i PCA3 Score e gli intervalli dei PCA3 Score indicati nel Referto dei rapporti. *I risultati che appaiono nel Sommario delle eccezioni potrebbero richiedere ulteriore azione e non sono refertabili.*

Il PCA3 Score viene calcolato come il rapporto fra le copie di RNA PCA3 e le copie di RNA PSA, moltiplicato per 1000. I punteggi PCA3 Score possono essere calcolati solo usando risultati derivanti da sedute e campioni validi. Le sedute e i campioni non validi devono essere rianalizzati per quell'analita (vedere *Ripetizione dell'analisi* per ulteriori informazioni).

Se il PCA3 Score riportato si trova al di sotto del valore soglia, il risultato va interpretato come NEGATIVO. Se il PCA3 Score è al di sopra del valore soglia o equivale ad esso, il risultato va interpretato come POSITIVO. Sarà il direttore del laboratorio a stabilire il valore soglia (vedere *Caratteristiche dell'esecuzione del test* per ulteriori informazioni).

In certe condizioni, viene fornito un intervallo di PCA3 Score (>[PCA3 Score calcolato] o <[Score calcolato]). Se il <[PCA3 Score calcolato] è al di sotto del valore soglia, il risultato va interpretato come NEGATIVO. Se il >[PCA3 Score calcolato] è al di sopra del valore soglia, il risultato va interpretato come POSITIVO. Se si richiede un valore numerico, la diluizione del campione e la ripetizione dell'analisi possono generare un PCA3 Score invece di un intervallo di PCA3 Score (vedere *Ripetizione dell'analisi - Diluizione di campioni alti fuori intervallo*).

2. Interpretazione dei codici di stato e di analisi

La colonna dello stato nel Referto dei dati grezzi sulla seduta e nel Referto dei rapporti mostra le informazioni in formato "s:a". I codici di stato specifici della seduta ("s") vengono indicati prima (alla sinistra) dei due punti mentre i codici di analisi specifici dell'analita ("a") vengono indicati dopo i (alla destra dei) due punti. I codici specifici dell'analita sono indicati in lettere minuscole per i risultati PCA3 e in lettere maiuscole per i risultati PSA. Ciascun referto contiene descrizioni dei codici di stato e analisi che appaiono in quel referto. Per esempio, i codici potrebbero indicare se un risultato relativo a un campione o un replicato è valido o è fuori intervallo. Consultare la *Guida di riferimento rapido* o il *Manuale d'uso del PROGENSA PCA3 Assay Software* per un elenco completo dei codici di stato e di analisi, e per ulteriori dettagli.

Se un PCA3 Score è riportato nel Referto dei rapporti, e nelle colonne dello stato del PCA3 o del PSA non compare nessun codice di stato o di analisi, ciò significa che entrambi gli analiti analizzati sono validi e "rientrano nell'intervallo". Il risultato dei campioni è refertabile e non sono necessarie ulteriori azioni.

Se un codice di stato o di analisi appare nel Sommario delle eccezioni o nel Referto dei rapporti, potrebbe essere necessario ripetere l'analisi (vedere *Interpretazione dei risultati nel Sommario delle eccezioni* e *Interpretazione dei*

risultati nel Referto dei rapporti). Se i risultati relativi all'analita provengono da sedute separate e presentano uno o più codici di analisi, trovare la combinazione per entrambi gli analiti nella Tabella 4 o nella Tabella 5 per determinare se è necessaria un'azione ulteriore.

***Nota -** La presenza di un codice di stato o di analisi non significa automaticamente che occorre ripetere l'analisi.*

3. Interpretazione dei risultati nel Sommario delle eccezioni

   Il Sommario delle eccezioni potrebbe non elencare alcuna eccezione. In questi casi, non occorrono ulteriori azioni.

   Se il Sommario delle eccezioni elenca uno o più campioni per le sedute consecutive nelle quali sono valide le sedute per entrambi gli analiti, consultare la Tabella 4 per istruzioni in merito.

   Per sedute di singoli analiti, consultare *Interpretazione dei codici di stato e di analisi*. In sedute consecutive nelle quali risulta non valida la seduta di un analita, ripetere la seduta non valida (vedere *Ripetizione dell'analisi* per ulteriori informazioni) e trattare i risultati come se fossero state eseguite singole sedute degli analiti. Occorrerà eseguire l'abbinamento manuale.

   Un campione può essere etichettato come non valido sebbene le provette individuali (replicati) possono essere etichettate come valide. È il risultato combinato dei replicati che determina la validità del campione, e una grande differenza fra replicati rende non valido un campione (vedere *Procedure di controllo della qualità* per ulteriori informazioni).

Tabella 4: Condizioni del Sommario delle eccezioni del PROGENSA PCA3 Assay

Risultato PCA3 (Codice di analisi*)	Risultato PSA (Codice di analisi*)	PCA3 Score elencato	Ulteriori analisi?	Azione/Commento
In intervallo (nessun codice)	Non valido** (A, B, E, H oppure I)	--	Sì	Rianalizzare il PSA (vedere *Ripetizione dell'analisi*) e abbinare manualmente i risultati.
Basso fuori intervallo (g)	Non valido (A, B, E, H oppure I)	--	Sì	Rianalizzare il PSA (vedere *Ripetizione dell'analisi*) e abbinare manualmente i risultati.
Non valido (a, b, e, h oppure i)	In intervallo (nessun codice)	--	Sì	Rianalizzare il PCA3 (vedere *Ripetizione dell'analisi*) e abbinare manualmente i risultati.
In intervallo (nessun codice)	Alto fuori intervallo (F)	<[PCA3 Score calcolato]***	Facoltativo	1. Abbinare manualmente per ottenere il <[PCA3 Score calcolato] OPPURE 2. Diluire il campione nel diluente apposito (vedere *Diluizione di campioni alti fuori intervallo*), rianalizzare il PSA e abbinare manualmente i risultati se si richiede un PCA3 Score.
Alto fuori intervallo (f)	In intervallo (nessun codice)	>[PCA3 Score calcolato]	Facoltativo	1. Abbinare manualmente per ottenere il >[PCA3 Score calcolato] OPPURE 2. Diluire il campione nel diluente apposito, rianalizzare il PCA3 e abbinare manualmente i risultati se si richiede un PCA3 Score.
Basso fuori intervallo (g)	In intervallo (nessun codice)	<[PCA3 Score calcolato]	No	Abbinare manualmente per ottenere il <[PCA3 Score calcolato].

Tabella 4: Condizioni del Sommario delle eccezioni del PROGENSA PCA3 Assay (continua)

Basso fuori intervallo (g)	Alto fuori intervallo (F)	<[PCA3 Score calcolato]	No	Abbinare manualmente per ottenere il <[PCA3 Score calcolato].

*Per un elenco completo dei codici di analisi, consultare il *PROGENSA PCA3 Assay Software Operator's Manual (Manuale dell'operatore del PROGENSA PCA3 Assay Software).*

** Pertiene solo a campioni non validi all'interno di una seduta valida.

*** Per valori fuori intervallo, il PCA3 Score calcolato viene calcolato usando il livello copia per il più vicino calibratore positivo.

4. Interpretazione dei risultati nel Referto dei rapporti

   Se un campione viene indicato nel Referto dei campioni con un PCA3 Score, il risultato è un PCA3 Score refertabile e non sono necessarie ulteriori azioni. Se non viene indicato un PCA3 Score, ovvero nella colonna del PCA3 Score è presente la dicitura "--", consultare la Tabella 5 per istruzioni.

Tabella 5: Condizioni del Referto dei rapporti del PROGENSA PCA3 Assay

Risultato PCA3 (Codice di analisi*)	**Risultato PSA (Codice di analisi*)**	**PCA3 Score elencato**	**Ulteriori analisi?**	**Azione/Commento**
In intervallo (nessun codice)	In intervallo (nessun codice)	PCA3 Score	No	Nessuna ulteriore azione; il risultato è refertabile.
Non valido** (a, b, e, h oppure i)	Non valido (A, B, E, H oppure I)	--	Sì	Rianalizzare entrambi gli analiti (vedere *Ripetizione dell'analisi*).
Non valido (a, b, e, h oppure i)	Alto fuori intervallo (F)	--	Sì	Diluire il campione nel diluente apposito (vedere *Diluizione di campioni alti fuori intervallo*), rianalizzare entrambi gli analiti.
Alto fuori intervallo (f)	Non valido (A, B, E, H oppure I)	--	Sì	Diluire il campione nel diluente apposito, rianalizzare entrambi gli analiti.
Alto fuori intervallo (f)	Alto fuori intervallo (F)	--	Sì	Diluire il campione nel diluente apposito, rianalizzare entrambi gli analiti.
Non valido (a, b, e, h oppure i)	Basso fuori intervallo (G)	--	No	Il campione non ha RNA sufficiente per l'analisi accurata. Occorre raccogliere un nuovo campione dal paziente.
In intervallo (nessun codice)	Basso fuori intervallo (G)	--	No	Il campione non ha RNA sufficiente per l'analisi accurata. Occorre raccogliere un nuovo campione dal paziente.
Alto fuori intervallo (f)	Basso fuori intervallo (G)	--	No	Il campione non ha RNA sufficiente per l'analisi accurata. Occorre raccogliere un nuovo campione dal paziente.
Basso fuori intervallo (g)	Basso fuori intervallo (G)	--	No	Il campione non ha RNA sufficiente per l'analisi accurata. Occorre raccogliere un nuovo campione dal paziente.

*Per un elenco completo dei codici di analisi, consultare il *Manuale dell'operatore del PROGENSA PCA3 Assay Software.*

** Pertiene solo a campioni non validi all'interno di una seduta valida. Se i campioni erano non validi perché la seduta era non valida, i risultati verranno indicati nel Sommario delle eccezioni (vedere *Interpretazione dei risultati nel Sommario delle eccezioni* per ulteriori informazioni).

D. Ripetizione dell’analisi

1. Linee guida per la ripetizione dell’analisi

   a. Sebbene non sia obbligatorio che entrambi gli analiti vengano analizzati nella stessa seduta, **i risultati relativi a entrambi gli analiti devono provenire dallo stesso flacone di campione per ottenere un PCA3 Score refertabile**.
   b. Tutte le sedute non valide vanno ripetute, e tutti i campioni non validi derivanti da sedute valide vanno rianalizzati.
   c. Rianalizzare i campioni usando una nuova serie di calibratori e controlli.
   d. Un’adeguata conservazione dei campioni avanzati prima della ripetizione dell’analisi è essenziale (vedere *Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni* per ulteriori informazioni).
   e. Un abbinamento manuale degli analiti PCA3 e PSA potrebbe essere necessario per determinare il PCA3 Score (vedere *Abbinamento manuale* per ulteriori informazioni).

2. Diluizione di campioni alti fuori intervallo

   a. Se la concentrazione di un campione estrapola sopra il Calibratore 5 all’interno di una seduta valida, il risultato è “alto fuori intervallo” e viene etichettato con un codice di analisi “f” o “F” nei referti della seduta. La concentrazione sarà espressa come >[Concentrazione Calibratore 5].
   b. Capovolgere il campione di urina trattato per miscelarlo prima della diluizione del campione stesso. La diluizione consigliata, ma non obbligatoria, è di 1:10 usando il PROGENSA PCA3 Specimen Diluent Kit. In un’apposita fiala, aggiungere 1800 µl di diluente per campione e 200 µl di campione; chiudere la provetta e capovolgerla cinque volte per miscelarla completamente. Il fattore di diluizione sarà “10” nella lista di lavoro della seduta. Se devono essere rianalizzati entrambi gli analiti, raddoppiare i volumi (usare 3600 µl di diluente del campione e 400 µl di campione). Consultare il foglietto illustrativo del PROGENSA PCA3 Specimen Diluent Kit. Analizzare il campione diluito con il dosaggio.
   c. Se, dopo la ripetizione dell’analisi, il risultato del campione è di nuovo alto fuori intervallo, si richiede un’ulteriore diluizione, fino a quando il risultato del campione non interpola all’interno dell’intervallo dei calibratori. È permissibile un’ulteriore diluizione della diluizione iniziale 1:10, purché la diluizione iniziale sia stata conservata correttamente (vedere *Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni* per ulteriori informazioni).

Limiti

A. Il PROGENSA PCA3 Assay non va usato per pazienti che stanno assumendo farmaci che sono noti influire sui livelli di PSA sierico, come il finasteride (Proscar, Propecia), il dutasteride (Avodart) e la terapia antiandrogena (Lupron). L'effetto di questi farmaci sull'espressione del gene PCA3 non è ancora stato valutato.

B. Certe procedure terapeutiche e diagnostiche come la prostatectomia, le radiazioni, la biopsia della prostata ed altre, potrebbero influire sulla vitalità del tessuto prostatico e di conseguenza influire sul PCA3 Score. L'effetto di queste procedure sulle prestazioni del dosaggio non è ancora stato valutato. I campioni per l'analisi PCA3 vanno raccolti quando il clinico ritiene che il tessuto prostatico si sia ripreso da tali procedure.

C. L'uso del PROGENSA PCA3 Assay va limitato al personale che è stato addestrato nella relativa procedura. La mancata osservanza alle istruzioni fornite in questo foglietto illustrativo può determinare risultati erronei.

D. Ciascun laboratorio deve convalidare in modo indipendente un processo di trasferimento al LIS.

E. Risultati affidabili dipendono da un'appropriata raccolta dei campioni di urina. Poiché il sistema di trasporto impiegato per il PROGENSA PCA3 Assay non permette la valutazione microscopica dell'adeguatezza dei campioni di urina, è necessario addestrare i medici sulle appropriate tecniche di raccolta dei campioni. Vedere *Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni*. Per istruzioni dettagliate, consultare il foglietto illustrativo contenuto nel PROGENSA PCA3 Urine Specimen Transport Kit.

F. I risultati del PROGENSA PCA3 Assay devono essere interpretati contestualmente ad altri dati di laboratorio e ai dati clinici a disposizione del medico. (I risultati della prova possono essere influenzati da un'erronea raccolta dei campioni, da errori tecnici o da scambi di campioni.)

Caratteristiche dell’esecuzione del test

A. Risultati clinici

1. Sensibilità e specificità diagnostiche

Le caratteristiche di prestazione per il PROGENSA PCA3 Assay sono state stabilite utilizzando campioni provenienti da soggetti iscritti presso quattro centri clinici nord-americani geograficamente diversificati. La popolazione dei soggetti consisteva in 529 uomini per i quali era programmata la biopsia della prostata. I dati demografici dei soggetti sono indicati sotto.

a. Età media ± DS = 64 ± 8 anni (valore mediano 63, intervallo dai 32 agli 89)
b. Livello medio di PSA sierico = 7,9 ± 21,9 µg/l (5,6, da 0,3 a 484)
c. Volume medio della prostata (determinato mediante ultrasuono trans-rettale) = 44 ± 25 cc (39, da 5 a 225)
d. 34% (180/529) positivi alla biopsia per il cancro alla prostata

La Figura 3 mostra la correlazione del PCA3 Score con la probabilità di una biopsia positiva. Con l’aumentare del PCA3 Score, è aumentata nei soggetti l’occorrenza di una biopsia positiva per il cancro.

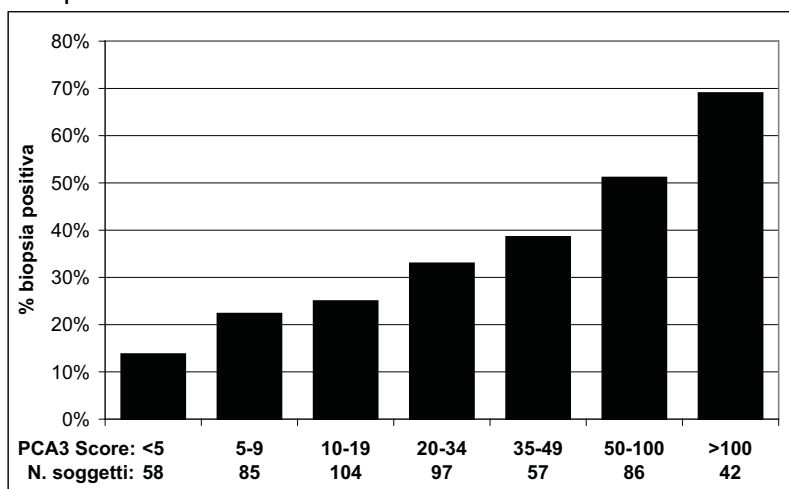



Figura 3. Correlazione di PCA3 Score con la probabilità di biopsia positiva

È stata eseguita l’analisi delle Caratteristiche Operative del Ricevente (ROC), usando la biopsia della prostata come metodo di riferimento, secondo CLSI GP10-A (1995) (4). Per il PROGENSA PCA3 Assay, l’area sotto la curva (AUC) è stata 0,685 (intervallo di confidenza del 95% = da 0,637 a 0,733). La Tabella 6 mostra la sensibilità e la specificità diagnostiche a diversi valori soglia di PCA3 Score. Ciascun laboratorio dovrebbe stabilire il proprio valore soglia per la sensibilità o la specificità diagnostiche (vedere *Interpretazione dei risultati*).

Tabella 6: Sensibilità e specificità diagnostiche del PROGENSA PCA3 Assay a diversi valori soglia del PCA3 Score

Valore soglia del PCA3 Score	5	10	15	25	35	50	95
Sensibilità	96%	85%	77%	63%	53%	41%	17%
Specificità	14%	33%	47%	61%	74%	84%	95%

2. Studi sulla stabilità dei campioni

   a. Stabilità nell'urina intera: urina di primo getto è stata raccolta da 10 soggetti e conservata a temperature comprese fra 2 °C e 8 °C o a 30 °C prima del trattamento mediante aggiunta di mezzo di trasporto dell'urina (UTM). A temperature comprese fra 2 °C e 8 °C, dopo 4 ore si è osservata in alcuni campioni una significativa degradazione dell'RNA di PCA3 e PSA. Di conseguenza, l'urina intera deve essere analizzata entro 4 ore. A 30 °C, si è osservata una significativa degradazione in meno di 1 ora. Di conseguenza, l'urina intera deve essere sempre refrigerata o tenuta in ghiaccio prima del trattamento.
   b. Stabilità nell'urina trattata: dodici campioni sono stati incubati a 4 °C o a 30 °C per un massimo di 38 giorni. A 4 °C, gli RNA di PCA3 e PSA si sono mantenuti stabili per 21 giorni; a 30 °C, per 5 giorni. I campioni conservati a -20 °C e a -70 °C hanno dimostrato la stabilità dell'RNA di PCA3 e PSA per un massimo di 90 giorni.
   c. Stabilità a seguito di congelamento e scongelamento: dei campioni sono stati fatti passare per 6 volte da 37 °C a -70 °C e viceversa. Non si è osservata una diminuzione dei livelli delle copie di RNA di PCA3 o PSA.

B. Risultati analitici

1. Sensibilità analitica

   Un pannello di sensibilità analitica composto da un trascritto di RNA *in vitro* diluito è stato usato per valutare la sensibilità del dosaggio. Un operatore ha analizzato il pannello in dodici sedute di cinque replicati, usando un unico lotto di reagenti. Il limite del rilevamento e il limite della valutazione quantitativa sono stati calcolati secondo CLSI EP17-A (2004) (5). Il limite del rilevamento dell'analita PCA3 è stato di 80 c/ml, e dell'analita PSA è stato di 1438 c/ml. Il limite della valutazione quantitativa di entrambi gli analiti è stato il Calibratore 2.

2. Specificità analitica

   a. Trascritto non accoppiato: il PROGENSA PCA3 Assay è stato concepito per rilevare solo l'RNA di PCA3 accoppiato esone 4-esone 3 specifico del cancro alla prostata (2). Il dosaggio non ha rilevato 1 milione di c/ml di RNA di PCA3 non accoppiato significativamente al di sopra del background.
   b. Specificità alla prostata dell'RNA di PCA3 nell'urina: campioni derivanti da soggetti che avevano subito una prostatectomia radicale (n = 97) sono stati analizzati con il PROGENSA PCA3 Assay, e i livelli di RNA di PCA3 sono stati confrontati con quelli di soggetti pre-biopsia (n = 464). Il livello mediano di c/ml di RNA di PCA3 è risultato al di sotto del limite di rilevamento del dosaggio per i campioni derivanti da soggetti post-prostatectomia, mentre il livello mediano di c/ml di RNA di PCA3 per i campioni derivanti da soggetti pre-biopsia è risultato pari a 7243 c/ml; questi dati confermano che l'RNA di PCA3 nell'urina proviene dalla prostata.
   c. Specificità tissutale: l'RNA totale è stato estratto dai tessuti di due donatori distinti di sesso maschile in base al tipo di tessuto, è stato aggiunto diluente ai campioni (10 ng per reazione) ed è stata eseguita l'analisi con il PROGENSA PCA3 Assay. Il tessuto della prostata è stato l'unico tipo di tessuto rilevato sopra il limite di rilevamento dell'RNA di PCA3 fra i tipi di tessuto indicati nella Tabella 7.

Tabella 7: Tipi di tessuto maschile analizzati per il rilevamento dell'RNA di PCA3

Tipo di tessuto	
Vescica (normale)	Rene
Vescica (tumorale)	Pene
Midollo osseo	Prostata
Dotto deferente	Vescicola seminale
Epididimo	Testicolo

d. Sostanze interferenti: le sostanze indicate nella Tabella 8 sono state aggiunte ad aliquote di urina maschile trattata raggruppata. I campioni sono stati analizzati con il PROGENSA PCA3 Assay secondo CLSI EP7-A2 (2005) (6). Alle concentrazioni indicate, non è stata osservata nessuna interferenza con il dosaggio.

Tabella 8: Sostanze analizzate per l'interferenza con il PROGENSA PCA3 Assay

Agenti terapeutici	
Sostanza	**Concentrazione della prova**
Acetaminofene/Codeina	5,34 µmol/l
Atorvastatina	25 mg/l
Lisinopril	0,74 µmol/l
Amlodipina	245 µmol/l
Atenololo	37,6 µmol/l
Sulfasalazina	754 µmol/l
Esomeprazolo	120 mg/l
Allopurinolo	294 µmol/l
Difenidramina	19,6 µmol/l
Acetaminofene	1324 µmol/l
Acido acetilsalicilico	3,62 mmol/l
Ibuprofene	2425 µmol/l
Furosemide	181 µmol/l
Ciproflossacina	30,2 µmol/l
Levaquin	48,6 µmol/l
Dossiciclina	67,5 µmol/l
Fluoxetina idroclorito	11,2 µmol/l
Flutamide	1500 mg/l
Dutasteride	1,5 mg/l

Agenti terapeutici (continua)	
Sostanza	**Concentrazione della prova**
Uroxatral	30 mg/l
Doxazosina	1,33 µmol/l
Terazosina	7,8 µmol/l
Finasteride	15 mg/l
Tamsulosina	1,2 µg/l
Metformina	310 µmol/l
Sildenafil	12,9 pmol/l
Serenoa repens	1600 mg/l
Selenio	0,275 mg/l

Costituenti dell'urina	
Sostanza	**Concentrazione della prova**
Acido urico	1,4 mmol/l
Emoglobina	2 g/l
Leucociti	4,56 x 10^7 cellule/l
Eritrociti	3,06 x 10^7 cellule/l
Albumina	50 g/l
Bilirubina (non coniugata)	342 g/l
IgG	60 g/l

3. Accuratezza

L'accuratezza del PROGENSA PCA3 Assay è stata valutata secondo CLSI EP15-A2 (2005) (7). Trascritti dell'RNA di PCA3 e PSA sono stati quantificati mediante spettrofotometria UV-Vis e aggiunti a normale urina femminile trattata (con nessun RNA di PCA3 o PSA rilevabile); quindi le concentrazioni sono state misurate nel PROGENSA PCA3 Assay. Il recupero percentuale (%) è stato calcolato come un rapporto fra c/ml misurati e c/ml aggiunti, moltiplicato per 100.

Tabella 9: Recupero delle copie del PROGENSA PCA3 Assay

Analita	Concentrazione nota, c/ml	Concentrazione misurata, c/ml	Recupero %
PCA3	750	808	108%
	7500	7618	102%
	18.750	18.722	100%
	75.000	70.287	94%
PSA	20.000	23.684	118%
	250.000	278.373	111%
	500.000	599.941	120%
	1.750.000	1.960.775	112%

4. Linearità e intervallo

L'intervallo lineare del PROGENSA PCA3 Assay è stato determinato secondo CLSI EP6-A (2003) (8) in base all'analisi di regressione lineare (minimi quadrati). Due gruppi di serie di diluizioni sono stati preparati partendo da campioni contenenti alte concentrazioni di RNA di PCA3 e PSA. Un gruppo è stato diluito in urina femminile trattata ed un gruppo in diluente del campione. Le diluizioni coprivano l'intero intervallo del dosaggio compreso fra i calibratori positivi più bassi e più alti per ciascun analita. Per entrambi gli analiti PCA3 e PSA, i risultati misurati dal dosaggio hanno mostrato una relazione proporzionale diretta fra le diluizioni analizzate ed i valori di c/ml di analita refertati. Non si è riscontrato un significativo effetto matrice del diluente. Vedere Figura 4.

Analita PCA3

Analita PSA

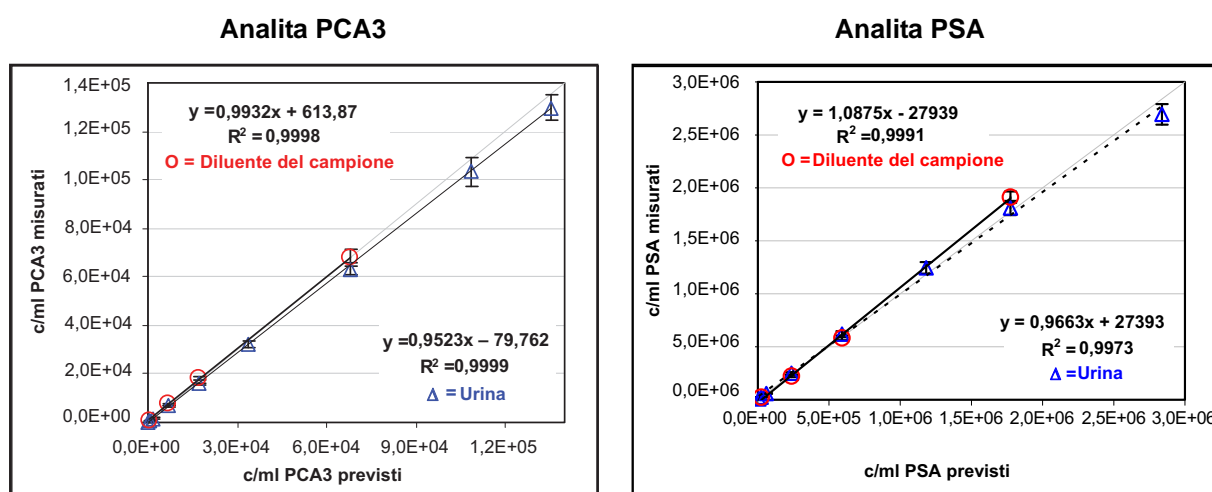



Figura 4. Linearità del PROGENSA PCA3 Assay per gli analiti PCA3 e PSA

5. Precisione

La precisione del PROGENSA PCA3 Assay è stata valutata secondo CLSI EP5-A2 (2004) (9). La ripetibilità è la precisione in condizioni di variabilità minima, e la riproducibilità è la precisione in condizioni di variabilità massima.

Per la ripetibilità, è stato preparato un pannello di analisi a 3 elementi composto da un trascritto di RNA *in vitro* diluito. Un operatore presso un laboratorio ha analizzato il pannello in 20 sedute di 5 replicati nell’arco di 20 giorni, usando un singolo lotto di calibratori e controlli, un singolo lotto di reagenti e una singola apparecchiatura. La Tabella 10 mostra la precisione della ripetibilità del PROGENSA PCA3 Assay a diversi livelli di concentrazione di analisi.

Tabella 10: Ripetibilità del PROGENSA PCA3 Assay

Analita	Pannello Elemento	Media c/ml	Ripetibilità DS	Ripetibilità CV
PCA3	1	1228	145	12%
	2	12.020	809	7%
	3	61.108	2489	4%
PSA	1	48.091	3715	8%
	2	484.457	41.026	8%
	3	2.001.430	131.554	7%

Per la riproducibilità, è stato preparato un pannello di analisi ad 8 elementi composto da campioni raggruppati (da 1 a 3) e da trascritto di RNA (da 4 a 8) *in vitro* diluito. Tre operatori hanno analizzato il pannello in 18 sedute nell’arco di 3 giorni, usando un unico lotto di calibratori e controlli, 3 lotti di reagenti e 3 serie di apparecchiature. Le Tabelle 11 e 12 riepilogano la precisione totale, nella stessa seduta, e la precisione fra sedute, operatori, apparecchiature e lotti diversi del PROGENSA PCA3 Assay per c/ml di analita e per PCA3 Score.

La variabilità nell’ambito di una seduta e quella fra operatori diversi e sedute diverse sono state, in ordine discendente, i fattori che hanno contribuito in maniera maggiore alla varianza complessiva del dosaggio. Il lotto di reagenti e l’apparecchiatura hanno dimostrato di contribuire poco alla varianza complessiva del dosaggio. Questi risultati dimostrano che il PROGENSA PCA3 Assay ha prestazioni riproducibili e che la fonte primaria della variazione è l’errore casuale (nell’ambito di una seduta).

Tabella 11: Riproducibilità del PROGENSA PCA3 Assay: analisi di copia/ml

Analita	Pannello Elemento	n	Misurato c/ml	CV totale	CV nell’ambi-to di una seduta	CV fra diverse sedute	CV, fra diversi operatori	CV, fra diverse apparec-chiature	CV, fra diversi lotti
PCA3	1	36	248	27%	24%	7%	15%	11%	0%
	2	36	7021	11%	6%	9%	9%	0%	0%
	3	36	31.469	8%	6%	5%	9%	0%	4%
	4	36	1469	15%	13%	7%	6%	0%	1%
	5	36	14.844	7%	5%	2%	6%	0%	4%
	6	36	72.372	7%	4%	6%	0%	1%	0%
	7	36	430	26%	26%	0%	11%	0%	1%
	8	36	62.274	13%	8%	8%	3%	0%	5%
PSA	1	34	52.739	9%	6%	6%	7%	4%	2%
	2	34	218.789	10%	6%	7%	7%	4%	0%
	3	32	1.073.920	11%	4%	6%	9%	8%	0%
	4	34	37.185	9%	5%	7%	3%	0%	1%
	5	32	386.504	10%	4%	8%	6%	3%	4%
	6	34	1.518.748	12%	5%	8%	4%	3%	7%
	7	32	11.007	14%	8%	9%	0%	6%	0%
	8	34	1.694.404	11%	7%	7%	0%	1%	6%

Tabella 12: Riproducibilità del PROGENSA PCA3 Assay: analisi del PCA3 Score

Pannello Elemento*	n	Punteggio medio	CV totale	CV nell’ambi-to di una seduta	CV fra diverse sedute	CV, fra diversi operatori	CV, fra diverse apparec-chiature	CV, fra diversi lotti
1	34	5	27%	26%	5%	23%	8%	0%
2	34	32	14%	9%	10%	12%	0%	2%
3	32	30	12%	7%	5%	17%	7%	6%
7	32	39	28%	24%	2%	8%	11%	7%
8	34	37	21%	14%	12%	0%	0%	9%

*Gli elementi del pannello da 4 a 6 contenevano solo trascritto di RNA di PCA3 o PSA e pertanto non sono stati inclusi in questa analisi.

Bibliografia

1. **Bussemakers, M.J.G., A. Van Bokhoven, G.W. Verhaegh, F.P. Smit, H.F.M. Karthaus, J.A. Schalken, F.M.J. Debruyne, N. Ru, and W.B. Isaacs.** 1999. DD3: A New Prostate-Specific Gene, Highly Overexpressed in Prostate Cancer. Cancer Res. **59**:5975-5979.
2. **Hessels, D., J.Mt. Klein Gunnewiek, I. van Oort, H.F.M. Karthaus, G.J.L. van Leenders, B. van Balken, L.A. Kiemeney, J.A. Witjes, and J.A. Schalken**. 2003. $DD3^{PCA3}$-based Molecular Urine Analysis for the Diagnosis of Prostate Cancer. European Urology. **44**:8-16.
3. **Groskopf J., S.M. Aubin, I.L. Deras, A. Blase, S. Bodrug, C. Clark, S. Brentano, J. Mathis, J. Pham, T. Meyer, M. Cass, P. Hodge, M.L. Macairan, L.S. Marks, and H. Rittenhouse.** 2006. APTIMA PCA3 Molecular Urine Test: Development of a Method to Aid in the Diagnosis of Prostate Cancer. Clin Chem. **52**:1089-95.
4. **CLSI**. 1995. CLSI document GP10-A, Assessment of the Clinical Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic (ROC) Plots. CLSI, Wayne, PA.
5. **CLSI.** 2004. CLSI document EP17-A, Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation. CLSI, Wayne, PA.
6. **CLSI**. 2005. CLSI document EP7-A2, Interference Testing in Clinical Chemistry. CLSI, Wayne, PA.
7. **CLSI**. 2005. CLSI document EP15-A2, User Verification of Performance for Precision and Trueness. CLSI, Wayne, PA.
8. **CLSI**. 2003. CLSI document EP6-A, Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach. CLSI, Wayne, PA.
9. **CLSI**. 2004. CLSI document EP5-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods. CLSI, Wayne, PA.

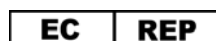
Sviluppato, fabbricato e distribuito da:

Gen-Probe Incorporated
San Diego, CA 92121 USA

Informazioni per contattarci negli U.S.A. e nel resto del mondo
Servizio clienti: +1 858 410 8002 customerservice@gen-probe.com
Assistenza tecnica: +1 858 410 8511 technicalsupport@gen-probe.com

Numero verde per chi chiama da U.S.A e Canada
Servizio clienti: +1 800 523 5001

Assistenza tecnica: +1 888 484 4747
www.gen-probe.com

EC REP

EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH, L'Aia
Paesi Bassi

501377IT Rev. D

2013-02